动 物 学 研 究 2006, Aug. 27 (4): 382－388 CN 53－1040/Q ISSN 0254－5853
Zoological Research

猪卵母细胞玻璃化冷冻后细胞骨架的变化

武彩红，芮 荣*，戴建军，谢 冰，剧世强，卢 晓
（南京农业大学 动物医学院，江苏 南京 210095）

摘要： 为研究玻璃化冷冻后猪卵母细胞纺锤体、染色体和微丝的变化，从屠宰猪卵巢表面直径2—5 mm卵泡中采集未成熟（GV）期卵母细胞，由GV期卵母细胞经成熟培养获得体外成熟（MⅡ）期卵母细胞。GV期和MⅡ期卵母细胞各分为3组：对照组、冷冻保护剂处理组和玻璃化冷冻组。MⅡ期卵母细胞经分组处理后直接用于激光扫描共聚焦显微镜（LSCM）观察样本；而GV期卵母细胞处理后先经44 h成熟培养，再用作LSCM观察样本。供试卵母细胞经固定、免疫荧光染色后，于LSCM下观察。结果表明，冷冻保护剂处理组GV期卵母细胞经成熟培养后，其纺锤体结构、染色体排列与微丝分布正常率分别为42.9%、89.6%和28.6%；玻璃化冷冻组此3项指标的正常率分别为10.1%、36.4%和16.9%，两组间差异显著（$P<0.05$）；除冷冻保护剂处理组染色体正常率与对照组无较大差异外，两试验组的其他指标均明显低于对照组（分别为79.5%、93.1%和72.3%，$P<0.05$）。MⅡ期卵母细胞冷冻保护剂处理组的纺锤体结构、染色体排列与微丝分布正常率分别为34.4%、61.3%和47.9%，而冷冻组分别为12.9%、56.7%和37.2%，两组均显著低于对照组（分别为78.3%、90.1%和72.8%，$P<0.05$）。结果表明，猪GV期和MⅡ期卵母细胞经冷冻保护剂处理或玻璃化冷冻保存后，均造成了纺锤体、染色体和微丝不可逆的损伤，这可能是影响卵母细胞成熟、受精与发育的重要原因。

关键词： 猪；卵母细胞；玻璃化冷冻；细胞骨架；激光扫描共聚焦显微镜
中图分类号： Q959.842；Q952.4；Q245 **文献标识码：** A **文章编号：** 0254－5853(2006)04－0382－07

Cytoskeletal Changes of Vitrified Porcine Oocytes

WU Cai-hong, RUI Rong*, DAI Jian-jun, XIE Bing, JU Shi-qiang, LU Xiao
(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: This experiment was designed to examine the spindle organization, and chromosomal and microfilament distribution of vitrified porcine oocytes. The germinal vesicle -stage (GV stage) oocytes were aspirated from antral follicles (2－5 mm in diameter). All Metaphase Ⅱ-stage (MⅡ stage) oocytes used in the experiment were derived from GV oocytes matured *in vitro*. Either GV or MⅡ stage oocytes were divided into three groups: the control group, the group treated with vitrification solution, and the vitrified group. Vitrified-warmed MⅡ oocytes derived from maturation *in vitro* were directly used for Laser-Scanning Confocal Microscopy (LSCM); vitrified-warmed GV oocytes were firstly cultured for 44 h and then used for LSCM. Oocytes used for the experiment were fixed and stained by immunofluorescence and were then observed by LSCM. The percentage of GV stage oocytes treated with vitrification solution with normal spindle organization, chromosome alignment and actin filaments (F-actin) distribution was 42.9%, 89.6% and 28.6%, respectively. These were significantly higher than those from the vitrified group of GV stage oocytes (10.1%, 36.4% and 16.9%, respectively; $P<0.05$). The values for GV oocytes treated with vitrification solution were all significantly lower than those from the control, except for the percentage with normal chromosome alignment (79.5%, 93.1% and 72.3%, respectively, $P<0.05$). The percentage of MⅡ stage oocytes from the group treated with vitrification solution and from the vitrified group with normal spindle organization, chromosome alignment and actin filaments (F-actin) distribution were 34.4% versus 12.9%, 61.3% versus 56.7%, and 47.9% versus 37.2%, respectively. These were significantly lower than those from the control (78.3%, 90.1% and 72.8%, respectively; $P<0.05$). Results from this experiment suggest that irreversible damage to the cytoskeleton of porcine GV and MⅡ oocytes after vitrification could be an important factor affecting

* 收稿日期：2006－03－22；接受日期：2006－05－30
基金项目：国家自然科学基金（30270958）；江苏省自然科学基金（BK2002108）；上海市科技兴农重点攻关项目（沪农科攻字［2003］第14－1号）
* 通讯作者（Corresponding author），Tel：025－84395595（O），Fax：025－84398669，E-mail：rrui@njau.edu.cn
第一作者简介：武彩红（1976－），博士研究生，研究方向为动物生殖生物学。E-mail：caihongwu616@yahoo.com.cn

the maturation, fertility and subsequent development of the oocytes.

Key words: Porcine; Oocytes; Vitrification; Cytoskeleton; Laser-scanning confocal microscopy

随着哺乳动物生殖生物学技术的发展，动物卵母细胞的冷冻保存，在动物种质资源保护上日益显示出强大的应用潜力。多种动物卵母细胞已被成功冷冻（Vajta et al，1998），但其冻后的受精率、发育率仍远远低于新鲜卵母细胞。有很多因素影响卵母细胞的冷冻保存。在这些因素中，卵母细胞的自身结构及其功能变化，是一个不可忽视的重要因素。研究表明，多数哺乳动物第二次减数分裂中期（Metaphase Ⅱ，MⅡ）卵母细胞纺锤体对低温特别敏感，当卵母细胞被冷却至室温或更低温度时，构成纺锤体的微管发生部分或全部解聚，进而导致染色体分布异常，影响其后的受精与发育（Boiso et al，2002；Rojas et al，2004；Albarracin et al，2005）。小鼠卵母细胞纺锤体在 0 ℃维持 45—60 min 后完全解聚（Magistrini & Szollosi，1980）；人卵母细胞纺锤体在室温或更低温度时，也发生部分或全部解聚（Almeida & Bolton，1995）。尽管复温后卵母细胞纺锤体可恢复，但恢复程度在复温后培养时间和动物种类上均有很大差异(Magistrini & Szollozi，1980；Aman & Parks，1994；Wang et al，2001）。处于 GV（Germinal vesicle）期的卵母细胞，其纺锤体尚未形成，但研究发现该期卵母细胞冷冻后，存活力与发育能力也有降低（Park et al，1997；Rojas et al，2004），相关原因仍不明了。

OPS（open pulled straw）法玻璃化冷冻，是新近发展起来的一种用于哺乳动物胚胎和卵母细胞冷冻保存的方法。由于其冷冻速率快，冷冻液用量少，有助于降低卵母细胞的冷冻损伤，是当前用于卵母细胞冷冻保存的理想方法之一（Vajta et al，1998）。近年来，本实验室对猪卵母细胞冷冻保存进行了系统研究，冷冻研究结果表明，猪 GV 期与体外成熟 MⅡ期卵母细胞在经 OPS 法玻璃化冷冻后，存活力与体外受精胚发育能力与新鲜卵母细胞相比均明显下降，GV 期与 MⅡ期卵母细胞间也有明显差异，以 GV 期卵母细胞冷冻保存效果为佳。为了进一步查明冷冻损伤的机理，作为该系统研究的一部分，本试验侧重对猪卵母细胞冷冻后，其纺锤体结构、染色体排列与微丝分布进行比较分析，以澄清卵母细胞玻璃化冷冻后，对细胞骨架造成的影响，为进一步探讨影响猪卵母细胞冷冻保存的机理提供实验参考。

1　材料与方法

1.1　卵母细胞来源

GV 期卵母细胞是用抽吸法从屠宰猪卵巢表面直径 2—5 mm 卵泡中采集，选用胞质均匀、包被 3 层及 3 层以上卵丘细胞的卵丘—卵母细胞复合体（COC），用 10%新生牛血清（NCS，GIBCO BRL 产品）TCM199（GIBCO 产品）洗 2—3 次后备用。所采集的 COC 经体外成熟，即可获得 MⅡ期卵母细胞（Fujihira et al，2004）。方法是每 15 枚 COC 一组，置于 100 μL 成熟培养液中，在 38.5 ℃、5 % CO_2 气相及饱和湿度条件下培养 44 h。

1.2　猪 GV 期与 MⅡ期卵母细胞的冷冻保存

本试验所用 MⅡ期卵母细胞，均由 GV 期卵母细胞体外成熟培养后获得。以 0.1%透明质酸酶溶液处理 MⅡ期卵母细胞约 5 min，并经吸管吹打去除扩散的卵丘细胞，经 TCM199 培养液洗 2—3 次后，用于玻璃化冷冻；以 COC 形式存在的 GV 期卵母细胞直接用于冷冻。

猪卵母细胞先在 20%乙二醇（EG，上海试剂一厂生产）TCM199 液中平衡 5 min，转入 40% EG +0.5 mol/L 蔗糖（上海化学试剂有限公司产品）TCM199 液中，于 30 s 内装入 OPS 管，每管装入 5 枚卵母细胞，约 2 μL 玻璃化液。装管后立即投入 -196 ℃液氮内冷冻保存。

解冻时，将 OPS 管从液氮取出直接置于 37 ℃的 0.5 mol/L 蔗糖溶液中，回收卵母细胞；平衡 5 min 后，将回收的卵母细胞再转入 0.25 mol/L 蔗糖溶液中平衡 5 min，TCM199 培养液洗 2—3 次备用。

1.3　卵母细胞的免疫荧光染色

用 3.7%多聚甲醛（上海凌峰试剂有限公司生产）PBS 液固定卵母细胞 30 min，经 PBS 洗 3 次后，转入 0.4% Triton X-100（Boster 产品）PBS 中作穿透处理 30 min，再转入 0.2%牛血清白蛋白（BSA，SIGMA 试剂）PBS 中封闭 1 h；之后对卵母细胞的微丝、微管及染色体作共染处理。固定、穿透、封闭和染色处理均在 37 ℃下进行。

封闭后的卵母细胞与抗 α 微管蛋白单克隆抗体（1∶50，NeoMarkers 产品）共同孵育 1.5—2 h，再

与抗小鼠 IgG – 生物素（1∶50，Boster 产品）孵育 1 h，再与抗生物素蛋白 – Cy5（2 μg/mL，Rockland 产品）共同孵育 30 min；然后与鬼笔环肽 – FITC（0.2 μg/mL，ALEXIS 产品）共同孵育 1 h，最后在 500 μg/mL 碘化丙啶（PI，Boster 产品）中染色 20 min。以上每次孵育后，均使用 37 ℃预热的 0.1% Tween 20（国药集团化学试剂有限公司）PBS（V/V）液洗 4 次，10 min/次。染色结束后，整装压片，用无色指甲油封片（Chen et al，2000；Liu et al，2003；Albarracin et al，2005）。

微管、微丝及染色体分别通过 Cy5、FITC 及 PI 定位，在激光扫描共聚焦显微镜（TCS SP2）观察其形态分布并摄片，三者分别呈蓝、绿和红色。

卵母细胞纺锤体被归为 3 类：（1）正常纺锤体：纺锤体呈桶状，染色体以不连续的束状排列于赤道板，微管横穿纺锤体，从一极横跨另一极，或从纺锤体极扩展到染色体；（2）异常纺锤体：微管没有排列成典型的纺锤体构型，或部分微管发生解聚；（3）无纺锤体出现：染色体周围没有观察到微管存在（Liu et al，2003）。

卵母细胞染色体被归为 3 类：（1）正常染色体：染色体排列在纺锤体赤道板上，或在无典型纺锤体存在时，致密存在于细胞质内的某一位置；（2）异常染色体：染色体分散存在于细胞质内；（3）染色体消失：细胞质内无染色体存在（Liu et al，2003）。

卵母细胞微丝分布则被分为（1）正常微丝：在质膜下可见均匀的肌动蛋白层；（2）异常微丝：在质膜下肌动蛋白呈不连续分布，或肌动蛋白带发生弥散；（3）无微丝存在：卵母细胞内没有观察到 F – 肌动蛋白存在（Albarracin et al，2005）。

1.4 实验设计

分别以猪 GV 期和 MⅡ期卵母细胞为研究对象，比较经冷冻保护剂处理和玻璃化冷冻后卵母细胞纺锤体、染色体及微丝的变化。

1.4.1 GV 期卵母细胞分组　GV 期卵母细胞分为 3 组：（1）对照组：卵母细胞不作任何处理，但进行体外成熟培养 44 h；（2）冷冻保护剂处理组：卵母细胞不作冷冻，但经过冻前、冻后的处理程序，再进行体外成熟培养 44 h；（3）玻璃化冷冻组：卵母细胞经 OPS 法玻璃化冷冻—解冻后，体外成熟培养 44 h。各组均在成熟培养结束后行免疫荧光染色、检查。

1.4.2 MⅡ期卵母细胞分组　MⅡ期卵母细胞分为 3 组：（1）对照组：新鲜卵母细胞不作处理直接染色；（2）冷冻保护剂处理组：体外成熟培养 42 h 的卵母细胞不作冷冻，但经过冻前、冻后的处理程序，之后继续培养 2 h，再行染色；（3）玻璃化冷冻组：COC 经体外成熟培养 42 h 后，用 OPS 法进行玻璃化冷冻，解冻后再培养 2 h、染色（Albarracin et al，2005）。

1.5 统计方法

实验重复 3 次以上，所获数据用 ANOVA 作差异显著性分析。

2 结　果

2.1 猪 GV 期卵母细胞处理后的细胞骨架变化

如表 1 所示，经激光扫描共聚焦显微镜观察，对照组 58 枚受试卵母细胞在体外成熟培养后，79.5%表现为正常纺锤体（图 1A），15.6%表现异常（图 1B、C、D），4.8%未见纺锤体（图 1E）。正常纺锤体卵母细胞，其染色体都排列在赤道板上；8 枚异常纺锤体卵母细胞，其染色体表现正常；1 枚未见纺锤体卵母细胞，亦未观察到染色体的存在；其余 3 枚卵母细胞，染色体分散于细胞质中。在冷冻保护剂处理组与冷冻组，卵母细胞培养后，其纺锤体正常率均显著下降，并且冷冻组明显低于冷冻保护剂处理组（$P<0.05$）；异常纺锤体和无纺锤体的卵母细胞比率也有显著上升（$P<0.05$）。冷冻保护剂处理组与冷冻组的染色体正常率降低，且冷冻组染色体正常率显著低于对照组（$P<0.05$）。处理组与冷冻组的染色体分散率增多，且冷冻组与对照组差异显著（$P<0.05$）。有趣的是，在异常纺锤体卵母细胞中，大多仍有正常的染色体排列（图 1B）。

冷冻保护剂处理与玻璃化冷冻对猪 GV 期卵母细胞微丝分布的影响见表 2。冷冻保护剂处理组与冷冻组卵母细胞，经体外成熟培养后的微丝分布正常率均显著下降，异常分布增加。

2.2 猪 MⅡ期卵母细胞处理后的细胞骨架变化

MⅡ期卵母细胞经冷冻保护剂处理或玻璃化冷冻后，其纺锤体和染色体正常率等指标列入表 3；冷冻保护剂处理与玻璃化冷冻对猪 MⅡ期卵母细胞微丝分布的影响见表 4。

3 讨　论

有关细胞超微结构的早期研究表明，细胞骨架

表 1　冷冻保护剂处理与玻璃化冷冻对猪 GV 期卵母细胞成熟纺锤体结构与染色体分布的影响

Tab. 1　Influence of cryoprotectants and vitrification on meiotic spindle organization and chromosome distribution of porcine GV oocytes

分组 Group	观察数 No. observed	纺锤体形态百分率 Percentage of spindle morphology (%)			染色体百分率 Percentage of chromosome (%)		
		正常 Normal	异常 Abnormal	未见 Absent	正常 Normal	分散 Dispersed	未见 Absent
对照组 Control	58	79.5 (46)[a]	15.6 (9)[a]	4.8 (3)[a]	93.1 (54)[a]	5.3 (3)[a]	1.6 (1)[a]
处理组 Treated	60	42.9 (26)[b]	26.3 (16)[a]	30.9 (18)[b]	89.6 (54)[a]	7.3 (4)[a]	3.0 (2)[a]
冷冻组 Vitrified	69	10.1 (7)[c]	46.5 (32)[b]	43.2 (30)[c]	36.4 (25)[b]	37.6 (26)[b]	26.1 (18)[b]

[a,b,c] 同一列中不同字母者表示差异显著（$P<0.05$）；括号内为相应的卵母细胞数。

[a,b,c] Values with different letters within columns are significantly different（$P<0.05$）; numbers in parenthesis represent the corresponding number of oocytes.

表 2　冷冻保护剂处理与玻璃化冷冻对猪 GV 期卵母细胞微丝分布的影响

Tab. 2　Influence of cryoprotectants and vitrification on distribution of actin filaments of porcine GV oocytes

分组 Group	观察数 No. observed	正常率 Normal rate (%)	异常率 Abnormal rate (%)	阴性率 Negative rate (%)
对照组 Control	58	72.3 (42)[a]	26.1 (15)[a]	1.6 (1)[a]
处理组 Treated	60	28.6 (17)[b]	43.2 (26)[b]	28.1 (17)[a]
冷冻组 Vitrified	69	16.9 (12)[c]	52.7 (36)[b]	30.4 (21)[b]

[a,b,c] 同一列中不同字母者表示差异显著（$P<0.05$）；括号内为相应的卵母细胞数。

[a,b,c] Values with different letters within columns are significantly different, $P<0.05$; numbers in parenthesis represent the corresponding number of oocytes.

表 3　冷冻保护剂处理与玻璃化冷冻后猪 MⅡ期卵母细胞成熟纺锤体形态与染色体分布

Tab. 3　Meiotic spindle organization and chromosome distribution of porcine MⅡ oocytes after treatment with cryoprotectants or vitrification

分组 Group	观察数 No. observed	纺锤体形态百分率 Percentage of spindle morphology (%)			染色体百分率 Percentage of chromosome (%)		
		正常 Normal	异常 Abnormal	未见 Absent	正常 Normal	分散 Dispersed	未见 Absent
对照组 Control	51	78.3 (40)[a]	15.7 (8)[a]	6.5 (3)[a]	90.1 (46)[a]	6.0 (3)[a]	3.9 (2)[a]
处理组 Treated	67	34.4 (23)[b]	41.7 (28)[b]	23.9 (16)[b]	61.3 (41)[b]	17.5 (17)[b]	13.5 (9)[b]
冷冻组 Vitrified	62	12.9 (8)[c]	49.9 (31)[c]	37.2 (23)[c]	56.7 (35)[b]	25.1 (11)[c]	25.8 (16)[c]

[a,b,c] 同一列中有不同字母者表示差异显著（$P<0.05$）；括号内为相应的卵母细胞数。

[a,b,c] Values with different letters within columns are significantly different, $P<0.05$; numbers in parenthesis represent the corresponding number of oocytes.

表 4　冷冻保护剂处理与玻璃化冷冻后猪 MⅡ期卵母细胞的微丝分布

Tab. 4　Distribution of actin filaments of porcine MⅡ oocytes after treatment with cryoprotectants or vitrification

分组 Group	观察数 No. observed	正常率 Normal rate (%)	异常率 Abnormal rate (%)	阴性率 Negative rate (%)
对照组 Control	51	72.8 (37)[a]	18.3 (9)[a]	8.9 (5)
处理组 Treated	67	47.9 (32)[b]	42.0 (28)[b]	9.5 (7)
冷冻组 Vitrified	62	37.2 (23)[c]	53.3 (33)[c]	10.1 (6)

[a,b,c] 同一列中不同字母者表示差异显著（$P<0.05$）；括号内为相应的卵母细胞数。

[a,b,c] Values with different letters within columns are significantly different, $P<0.05$; numbers in parenthesis represent the corresponding number of oocytes.

的主要功能是对细胞器膜层结构进行组织和固定，其中起主要作用的是微丝和微管。研究发现，微丝和微管同样与卵母细胞成熟、受精及胚胎发育关系密切，并对其中的一些动力学事件起着决定性的作用（Chen et al，2004；Kim et al，1996，1998）。卵母细胞成熟纺锤体主要由微管构成，且在纺锤体之

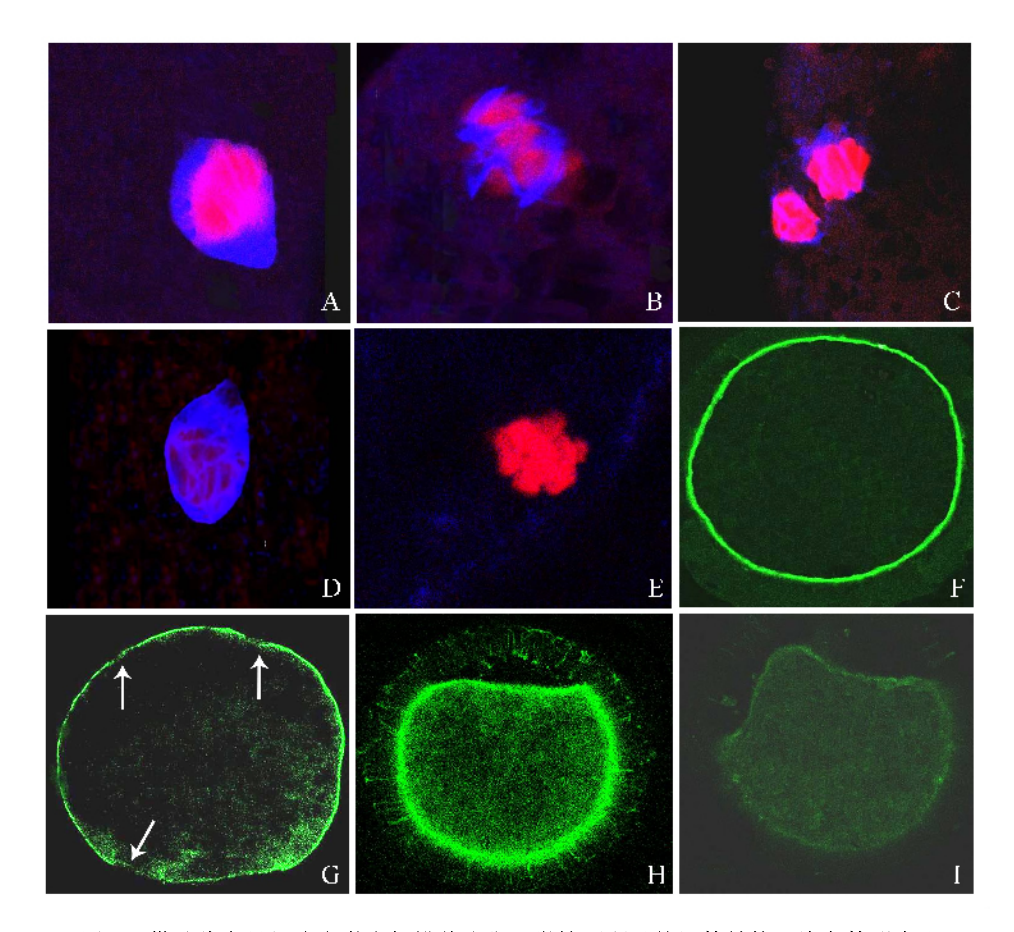


图 1　供试猪卵母细胞在激光扫描共聚焦显微镜下所见纺锤体结构、染色体形态和 F－肌动蛋白分布情况

Fig. 1　Confocal micrographs of porcine oocytes used in the experiment showing spindle organization, chromosome alignment and actin filaments localization

构成微丝的 F－肌动蛋白呈绿色；微管呈蓝色；染色体呈红色；粉红色：蓝色和红色共染（Green images: actin filaments; blue images: microtubules; red images: chromosomes; pink images: overlay of blue and red）。

A. 正常的纺锤体结构，染色体排列于赤道板（An oocyte shows a normal meiotic spindle organization and chromosome alignment）；B. 染色体排列正常，但纺锤体极消失（Chromosome aligned normally, but poles of spindle disappeared）；C. 纺锤体部分解聚，但染色体正常（Partially disassembled spindle, with normal chromosome alignment）；D. 纺锤体部分解聚，染色体消失（Partially disassembled spindle, without chromosome alignment）；E. 染色体分散存在，纺锤体消失（Dispersed chromosomes without spindle presence）；F. 正常分布的肌动蛋白，均匀地存在于细胞质膜下（Normal distribution of actin filaments: actin filaments evenly located beneath the plasma membrane）；G. 肌动蛋白呈不连续分布，箭头所示断裂处（Actin filaments distributed discontinuously with the rupture arrowed）；H. 肌动蛋白弥散分布（Actin filaments diffuse）；I. 无肌动蛋白存在（Actin filaments absent）。

外并无微管存在（Inoue，1981）。正常染色体在微管装配为纺锤体及胚胎发育过程中都具有重要作用（Zhang & Nicklas，1995；Eroglu et al，1998）。因此，在卵母细胞成熟、受精及其后的发育过程中，微丝、微管和染色体的功能是相互协调、密不可分的。

卵母细胞纺锤体对低温非常敏感，经低温处理的不同动物卵母细胞，复温后纺锤体恢复程度也不相同。Liu et al（2003）报道，猪 MⅡ期卵母细胞在 24 ℃维持 5 min，纺锤体即开始解聚；当温度降至 4 ℃时，其解聚速度加快，复温后纺锤体恢复程度很有限。Pickering & Johnson（1987）报道，小鼠卵母细胞于 4 ℃放置 1 h 后，当温度恢复到 37 ℃时，有 89%的卵母细胞恢复正常的纺锤体形态。由此可见，猪卵母细胞纺锤体对于低温环境更为敏感。本试验结果表明，OPS 法玻璃化冷冻后，无论是 GV 期还是 MⅡ期猪卵母细胞，纺锤体形态正常率均比对照组显著下降；即使是不作冷冻，仅用冷

冻保护剂处理，也会影响到纺锤体形态。有报道表明，卵母细胞对于玻璃化液处理也很敏感（Rojas et al，2004；Albarracin et al，2005），本实验进一步佐证了这些报道的结果。构成纺锤体的微管，主要是由 α 和 β 微管蛋白及少量微管结合蛋白（MAP）聚合而成。冷冻液或冷冻导致纺锤体结构破坏，可能是由于这些因素诱导了微管蛋白解聚，破坏了正常的微管结构，进而导致纺锤体形成发生紊乱或不能形成。在 MⅡ期卵母细胞，染色体通过着丝粒捕获纺锤体微管，并排列于成熟纺锤体赤道板上，这种方式保证了受精后染色体的正确分离，正常染色体反过来又增强了纺锤体微管的装配。因此，一旦纺锤体受到破坏，受精后的染色体分离便发生异常，胚胎的非整倍体及多倍体发生率增加，胚胎的正常发育会受到影响。此外，当染色体发生异常时，微管虽可在染色体周围进行组装，但不能形成正常纺锤体（Liu et al，2003）。本实验中发现的一些异常纺锤体情况，推测也是由上述的一些变化引发的。因此，减少纺锤体与染色体损伤，对卵母细胞的成熟、受精与发育都具有重要的意义。

GV 期卵母细胞的胞质内存在大量微丝，在卵母细胞经历生发泡破裂（GVBD）而进入第一次成熟分裂中期（MⅠ期）后，微丝减少；但微丝并不是 GVBD 发生的必要条件。Longo & Chen（1985）报道，微丝和微管破坏并没有阻断 GVBD 和染色体凝集，然而卵母细胞进一步发育会受到抑制。在猪上，卵母细胞微丝不影响 GVBD、染色体凝集和 MⅠ期纺锤体形成等早期成熟分裂发育，但微丝破坏后，MⅠ期纺锤体位置及随后的成熟过程会受到抑制（Sun et al，2001）。对小鼠卵母细胞的研究表明，在卵母细胞成熟过程中，微丝与微管影响皮质颗粒向皮质区的迁移（Connors et al，1998）；而只有皮质颗粒出现于皮质区，卵母细胞才能达到成熟。在 GV 期卵母细胞，染色体仍位于细胞核内、纺锤体尚未形成，但冷冻液或冷冻处理破坏了微丝的装配，进而影响卵母细胞的成熟。Sun et al（2001）报道，猪卵母细胞受精时，微丝在精子穿透中起重要作用。Wang et al（2000）在猪卵母细胞成熟和胚胎发育研究中发现，若 F－肌动蛋白聚合受到抑制，则会阻止卵母细胞成熟和胚胎发育的进程。因此，对于 MⅠ期卵母细胞来说，冷冻液或冷冻处理后，即使纺锤体和染色体仍正常，若微丝受到破坏，受精率和胚胎发育率也会降低。Aigner et al（1992）的研究也表明，冷冻保护剂破坏了皮质内微丝网络，引起构成纺锤体的微管解聚，导致纺锤体形成发生紊乱或不能形成，染色体发生分散。因此，冷冻液或冷冻处理后，无论卵母细胞处于哪一时期，只要纺锤体、染色体或 F－肌动蛋白中的一个受到损伤，都会影响冻后的发育，甚至导致冷冻失败。

卵母细胞的成熟与受精过程中，还牵涉到许多分子机制。对小鼠的研究结果表明，丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）在控制卵母细胞染色质和微管变化方面起重要作用，MAPK 的激活可使微管和染色质进入成熟中期（Verlhac et al，1994）。另外，成熟促进因子（MPF）（Arellano et al，1993）、多态生长因子（PGF）（Del Campo et al，1995）、成熟抑制因子（OMⅠ）（Armstrong & Xia，1993）和细胞生长抑制因子（CSF）（Funahashi et al，1994）等，在调节卵母细胞成熟与受精过程中也具有重要意义。玻璃化液与玻璃化冷冻是否也对猪的卵母细胞成熟与受精机制造成影响，目前尚不清楚，有待进一步研究。

本研究结果表明，猪 GV 期和 MⅡ期卵母细胞经玻璃化液处理或玻璃化冷冻保存后，都明显造成了纺锤体、染色体和微丝不可逆的损伤，这可能是影响卵母细胞成熟、受精与发育的重要原因。人们一直把猪卵母细胞难以冷冻的原因归于其脂滴含量高，本研究也是对该问题复杂性的一个暗示和证明。

致谢：南京农业大学作物遗传育种及种质创新国家重点实验室为本试验提供激光扫描共聚焦显微镜设备条件，该实验室刘晓祥同志在设备操作上给予帮助，特此致谢。

参考文献：

Aigner S，Van der Elst J，Siebzehnrubl E，Wildt L，Lang N，Van Steirteghem AC．1992．The influence of slow and ultra-rapid freezing on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocyte［J］．*Hum Reprod*，**7**（6）：857－864．

Albarracin JL, Morato R, Rojas C, Mogas T. 2005. Effects of vitrification in open pulled straws on the cytology of *in vitro* matured prepubertal and adult bovine oocytes [J]. *Theriogenology*, **63** (3): 890 – 901.

Almeida PA, Bolton VN. 1995. The effect of temperature fluctuations on the cytoskeletal organization and chromosomal constitution of the human oocyte [J]. *Zygote*, **3** (4): 357 – 365.

Aman RR, Parks JE. 1994. Effects of cooling and rewarming on the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro* matured bovine oocytes [J]. *Biol Reprod*, **50** (1): 103 – 110.

Arellano J, Illera MJ, Lorenzo P, Sanchez J, Silvan G, Illera JC, Illera M, Petters RM. 1993. Epidermal growth factor enhances porcine oocyte maturation *in vitro* in the absence of follicular fluid or hormones [J]. *Theriogenology*, **39** (1): 180.

Armstrong DT, Xia P. 1993. Differential mitogenic actions of insulin-like growth factor-I and FSH on bovine cumulus cells and granulosa cells [J]. *Theriogenology*, **39** (1): 181.

Boiso I, Marti M, Santalo J, Ponsa M, Barri PN, Veiga A. 2002. A confocal microscopy analysis of the spindle and chromosome configurations of human oocytes cryopreserved at the germinal vesicle and metaphase Ⅱ stage [J]. *Hum Reprod*, **17** (7): 1885 – 1891.

Chen CK, Wang CW, Tsai WJ, Hsieh LL, Wang HS, Soong YK. 2004. Evaluation of meiotic spindles in thawed oocytes after vitrification using polarized light microscopy [J]. *Ferti Steril*, **82** (3): 666 – 672.

Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chao KH, Ho NH, Yang YS. 2000. Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws [J]. *Hum Reprod*, **15** (12): 2598 – 2603.

Connors SA, Kanatsu-Shinohara M, Schultz RM, Kopf GS. 1998. Involvement of the cytoskeleton in the movement of cortical granules during oocyte maturation, and cortical granule anchoring in mouse eggs [J]. *Dev Biol*, **200** (1): 103 – 115.

Del Campo MR, Donoso X, Parrish JJ, Ginther OJ. 1995. Selection of follicles, preculture oocyte evaluation, and duration of culture for *in vitro* maturation of equine oocytes [J]. *Theriogenology*, **43** (7): 1141 – 1153.

Eroglu A, Toth TL, Toner M. 1998. Alterations of the cytoskeleton and polyploidy induced by cryopreservation of metaphase Ⅱ mouse oocytes [J]. *Fertil Steril*, **69** (5): 944 – 957.

Fujihira T, Kishida R, Fukui Y. 2004. Developmental capacity of vitrified immature porcine oocytes following ICSI: Effects of cytochalasin B and cryoprotectants [J]. *Cryobiology*, **49** (3): 286 – 290.

Funahashi H, Cantley TC, Day BN. 1994. Different hormonal requirements of pig oocyte-cumulus complexes during maturation *in vitro* [J]. *J Reprod Fertil*, **101** (1): 159 – 165.

Inoue S. 1981. Cell division and the mitotic spindle [J]. *J Cell Biol*, **91** (3 Pt 2): 131s – 147s.

Kim NH, Day BN, Lee HT, Chung KS. 1996. Microfilament assembly and cortical granule distribution during maturation, parthenogenetic activation and fertilization in the porcine oocyte [J]. *Zygote*, **4** (2): 145 – 149.

Kim NH, Chung HM, Cha KY, Chung KS. 1998. Microtubule and microfilament organization in maturing human oocytes [J]. *Hum Reprod*, **13** (8): 2217 – 2222.

Liu RH, Sun QY, Li YH, Jiao LH, Wang WH. 2003. Effects of cooling on meiotic spindle structure and chromosome alignment within *in vitro* matured porcine oocytes [J]. *Mol Reprod Dev*, **65** (2): 212 – 218.

Longo FJ, Chen DY. 1985. Development of cortical polarity in mouse eggs: Involvement of the meiotic apparatus [J]. *Dev Biol*, **107** (2): 382 – 394.

Magistrini M, Szollosi D. 1980. Effects of cold and isopropyl-N-phenylcarbamate on the second meiotic spindle of mouse oocytes [J]. *Eur J Cell Biol*, **22** (2): 699 – 707.

Park SE, Son WY, Lee SH, Lee KA, Ko JJ, Cha KY. 1997. Chromosome and spindle configurations of human oocytes matured *in vitro* after cryopreservation at the germinal vesicle stage [J]. *Fertil Steril*, **68** (5): 920 – 926.

Pickering SJ, Johnson MH. 1987. The influence of cooling on the organization of the meiotic spindle of the mouse oocytes [J]. *Hum Reprod*, **2** (3): 207 – 216.

Rojas C, Palomo MJ, Albarracin JL, Mogas T. 2004. Vitrification of immature and *in vitro* matured pig oocytes: Study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments [J]. *Cryobiology*, **49** (3): 211 – 220.

Sun QY, Lai LX, Park KW, Kuhholzer B, Prather RS, Schatten H. 2001. Dynamic events are differently mediated by microfilaments, microtubules, and mitogen-activated protein kinase during porcine oocyte maturation and fertilization *in vitro* [J]. *Biol Reprod*, **64** (3): 879 – 889.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos [J]. *Mol Reprod Dev*, **51** (1): 53 – 58.

Verlhac MH, Kubiak JZ, Clarke HJ, Maro B. 1994. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocyte [J]. *Deveoopment*, **120** (4): 1017 – 1025.

Wang WH, Abeydeera LR, Prather RS, Day BN. 2000. Polymerization of nonfilamentous actin into microfilaments is an important process for porcine oocyte maturation and early embryo development [J]. *Biol Reprod*, **62** (5): 1177 – 1183.

Wang WH, Meng L, Hackett RJ, Odenbourg R, Keefe DL. 2001. Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy [J]. *Hum Reprod*, **16** (11): 2374 – 2378.

Zhang D, Nicklas RB. 1995. Chromosomes initiate spindle assembly upon experimental dissolution of the nuclear envelope in grasshopper spermatocytes [J]. *J Cell Biol*, **131** (5): 1125 – 1131.